IMMUCOR

Pak12® coffret

REF PAK12 IVD CE

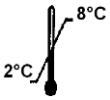

TABLE DE MATIÉRES

UTILISATIONS PRÉVUES **2**
SOMMAIRE ET EXPLICATION **2**
PRINCIPE **2**
REAGENTS **2**
PRÉCAUTIONS **3**
AVERTISSEMENTS **3**
ÉCHANTILLONS **3**
MODE OPÉRATOIRE **3**
Matériel Fourni 3
Matériel Nécessaire non Fourni 4
Procédure 4
CONTROLE QUALITÉ **5**
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS **6**
LIMITES DE LA TECHNIQUE **6**
PERFORMANCES SPÉCIFIQUES **6**
REFERENCES **7**

UTILISATIONS PRÉVUES

Pak12 coffret est un essai qualitatif par la méthode ÉLISA (enzyme linked immunosorbent assay) en phase solide conçu pour détecter des anticorps contre des antigènes HLA de classe I et des épitopes sur les glycoprotéines IIb/IIIa, Ia/IIa, et Ib/IX.

SOMMAIRE ET EXPLICATION

L'existence d'antigènes spécifiques de plaquettes sur diverses glycoprotéines plaquettaires a été décrite par plusieurs investigateurs.[1,2,3,4,5,6] Les anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques de plaquettes ou contre des molécules HLA de classe I générés lors d'une grossesse ou d'une transfusion peuvent causer l'immuno-destruction des plaquettes transfusées.[7,8,9] La confirmation de la présence de ces anticorps dans le sérum des patients peut aider la recherche de produits sanguins potentiellement compatibles.

Les micropuits ÉLISA en phase solide Pak12 fournissent les glycoprotéines plaquettaires IIb/IIIa et Ia/IIa, isolées par anticorps monoclonaux et provenant de donneurs du groupe O de type plaquettaire connu. Les molécules de classe I et les glycoprotéines plaquettaires Ib/IX sont fournies sous forme de glycoprotéines purifiées par affinité. Ce test est conçu pour détecter et différencier les anticorps dirigés contre les molécules HLA de classe I et les antigènes spécifiques de plaquettes. La configuration des puits se trouve sur le tableau de résultats.

PRINCIPE

Le sérum ou le plasma est ajouté aux micropuits enrobés de glycoprotéines plaquettaires et de molécules HLA permettant à l'anticorps, si présent, de se lier. Les anticorps non liés sont alors lavés. Un réactif anti-globuline humaine conjugué à la phosphatase alcaline (Anti-IgG/A/M) est ajouté aux puits et incubé. Les Anti-IgG/A/M non liés sont lavés et le substrat PNPP (p-nitrophényl phosphate) est ajouté. Après 30 min d'incubation la réaction est arrêtée. La densité optique de la couleur qui se développe est mesurée au spectrophotomètre.

COMPOSITION DU COFFRET

Nombre maximum de tests par coffret:

- **PAK12 coffret: 5 tests par coffret**

Tous les réactifs doivent être entreposés selon les instructions indiquées sur l'étiquette.

	REF	
MS	404551	Micropuits: barrettes avec micropuits à fond plat auxquels des glycoprotéines plaquettaires et des molécules HLA ont été attachées. Les barrettes sont incluses dans des sachets refermables. Prêt à l'emploi
TCW	403622	Solution de lavage concentrée (10X): solution tamponnée de Tris (hydroxyméthyl) aminométhane contenant du chlorure de sodium et du Tween 20. 1% d'azide de sodium. Diluer avec de l'eau déionisée ou distillée avant utilisation. Conserver la solution de lavage de travail jusqu'à 48 heures à la température de la pièce ou jusqu'à 7 jours à une température de 2 à 8°C.
SD	403831	Tampon pour échantillon: solution saline tamponnée au phosphate contenant de l'albumine bovine et du sérum de souris. 0,1% d'azide de sodium. Prêt à l'emploi.
SB	403613	Tampon de substrat: Cette solution contient du diéthanolamine et du chlorure de magnésium. 0,02% d'azide de sodium. Prêt à l'emploi. A protéger de la lumière.
ESS	403603	Solution d'arrêt: Prêt à l'emploi.
AH	404589	Conjugué: Anticorps de chèvre anti-immunoglobuline IgG/A/M humaine, purifié par affinité et conjugué à la phosphatase alcaline. 0,1% d'azide de sodium. Diluer avec le tampon pour échantillon avant utilisation.
PN	403594	Substrat PNPP (p-nitrophényl phosphate): Poudre crystalline. Reconstituer avec de l'eau déionisée ou distillée et diluer avec le tampon de substrat avant utilisation. A protéger de la lumière.
PC	404596	Sérum contrôle positif: sérum humain. 0,1% d'azide de sodium. A diluer dans le tampon pour échantillon avant utilisation.

NC	404572	Sérum contrôle négatif: sérum humain. 0,1% d'azide de sodium. A diluer dans le tampon pour échantillon avant utilisation.
PS	503019	Scellants pour plaques.

PRÉCAUTIONS

- Ne pas utiliser de réactifs qui sont troubles ou contaminés.
- Prendre des précautions pour éviter la contamination du tampon pour échantillon et conjugué. Une contamination involontaire de ces réactifs avec du sérum humain ou du plasma entraînera la neutralisation du conjugué et ainsi l'échec du test.
- Ne pas utiliser de réactifs au-delà de la date de péremption.
- Les micropuits et les réactifs inclus dans ce coffret ne doivent pas être utilisés conjointement avec aucun autre ensemble de test.
- La substitution de composantes autres que ceux fournies dans ce coffret peut entraîner des résultats incohérents ou erronés.
- Après chaque essai, jeter toute préparation inutilisée (conjugué dilué, des contrôles positif et négatif dilués, réactif PNPP reconstitué et dilué).
- Lors de la préparation des dilutions, pipetter selon les instructions du fabricant afin d'assurer des techniques de distribution et de rinçage appropriées.
- La réaction entre l'enzyme et le substrat, se produisant lors de l'incubation finale, est sensible à la température et la lumière et doit être exécutée dans un environnement contrôlé de 22-25°C, à l'abri de la lumiére.

AVERTISSEMENTS

- Tous les sérums d'origine humaine utilisés dans les contrôles négatifs et positifs ont été testés et trouvés négatifs concernant les anticorps anti-VIH 1+2, l'hépatite C et l'antigène HBs. Cependant aucune méthode ne peut offrir une totale assurance de l'absence de ces virus ou autres agents infectieux. Par conséquent, ces matériaux doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.
- Certains réactifs fournis dans ce coffret contiennent l'azide de sodium comme agent de conservation.
  MISE EN GARDE: L'azide de sodium réagit avec le plomb et le cuivre de la plomberie pour former des métaux azides hautement explosifs. Lorsque jeté dans l'évier, il est recommandé de rincer avec beaucoup d'eau pour éviter la concentration d'azide. L'azide de sodium est un poison, toxique si ingéré.
- Jeter les réctifs terminés selon les règlements locaux.

ÉCHANTILLONS

Le sang devrait être prélevé dans de l'ACD ou de l'EDTA (plasma) ou sans anticoagulant (sérum) selon des techniques aseptiques. Le sang devrait être testé pendant qu'il est encore frais afin de minimiser les risques d'obtenir de faux positifs ou de faux négatifs causés par un mauvais entreposage ou une contamination de l'échantillon. Les échantillons qui ne peuvent être testés immédiatement doivent être conservés à une température de 2-8°C jusqu'à 48 heures suivant le prélèvement, ou congelés. Les échantillons congelés à une température $\leq$ –20°C se conservent bien pendant plusieurs années (2 à 3 ans). Cependant, pour éviter les effets néfastes de cycles répétés de congélation – décongélation, il est recommandé d'aliquoter les échantillons en petits volumes avant de les congeler. Éviter les congélateurs à dégrivrage automatique.

Le sérum ou le plasma doit être séparé des globules rouges lorsque conservé ou expédié.

Des particules ou des agrégats dans l'échantillon peuvent causer des résultats faux positifs ou de mauvaises valeurs de duplicata. Ces échantillons doivent être clarifiés par centrifugation avant d'être testés.

Seul le sérum humain entier ou le plasma est approprié pour cet essai. La dilution préalable des échantillons avec tout autre chose que le sérum humain normal, négatif pour ÉLISA, peut modifier les résultats.

Des échantillons contaminés par des microbes, hémolysés, lipémiques, ictériques ou inactivés par la chaleur peuvent donner des résultats incohérents et doivent être évités.

MODE OPÉRATOIRE

Matériel Fourni

Les flacons peuvent contenir une quantité de réactif plus grande que celle indiquée sur l'étiquette. Bien mesurer le réactif avec un instrument approprié pour préparer les dilutions.

1. 6 – 2 x 8 barrettes de micropuits codées par couleurs avec support
2. 1 x 50 ml solution de lavage concentrée (10X)
3. 1 x 14 ml tampon pour échantillon
4. 1 x 14 ml tampon de substrat
5. 1 x 14 ml solution d'arrêt

6. 1 x 80 µl conjugué anti-IgG/A/M humain
7. 3 x 50 mg substrat PNPP
8. 1 x 0,3 ml sérum contrôle positif
9. 1 x 0,7 ml sérum contrôle négatif
10. 6 scellants pour plaques

Matériel Nécessaire non Fourni

1. Tubes à essai pour échantillons de patients, dilution des contrôles et dilution des réactifs.
2. Pipettes de transfert
3. Micropipettes ajustables pour distribuer 10 – 100 µl et 100 – 1000 µl avec des embouts jetables
4. Chronomètre
5. Lecteur de microplaque capable de mesurer des densités optiques de 405, 410 et 490 nm
6. Eau déionisée ou distillée
7. Papier absorbant
8. Instrument pour laver les microplaques
9. Centrifugeuse capable de séparer le serum ou le plasma des échantillons de patients
10. Incubateur ou bain-marie à 37°C

Procédure

1. Amener tous les réactifs à la température de la pièce.

2. Préparer une solution de lavage de travail en diluant la solution de lavage concentrée. Ajouter 1 volume de solution de lavage concentrée à 9 volumes d'eau déionisée ou distillée. **Bien mélanger**.

3. Déterminer le nombre d'échantillons de patients à tester. Utiliser le tableau de résultats pour assigner chaque échantillon à un emplacement consistant en deux puits (duplicata). Noter l'identité de chaque échantillon sur le tableau de résultats.

Préparation des Échantillons et des Contrôles

4. Diluer comme suit et bien mélanger:

	Volume de tampon pour échantillon	**Volume d'échantillon**
PC	150 µl	50 µl
NC	600 µl	200 µl
Échantillon de patient	600 µl	200 µl

5. Retirer la monture de micropuits du sachet. Retirer rapidement et resceller toutes barrettes non utilisées dans le sachet protecteur.

NOTE: Une seule monture est fournie par coffret. Ne pas la jeter avant que toutes les barrettes aient été utilisées.

NOTE: Orienter la plaque afin que le puits A1 se situe dans le coin en haut à gauche. Soyez certain que toutes les barrettes soient mises de façon appropriées et insérées à la plaque. Etiqueter ou numéroter chaque barrette afin d'éviter des erreurs. Maintenir la même orientation de plaque durant tout l'essai.

6. Ajouter 300 µl de solution de lavage de travail à chaque puits et laisser reposer 5 à 10 minutes à la température de la pièce.

7. Aspirer ou décanter énergiquement et inverser sur du tissu-éponge absorbant pour empêcher de s'assécher.

8. Ajouter 50 µl de la dilution appropriée du contrôle ou de l'échantillon aux puits désignés sur le tableau de résultats.

NOTE: Ne pas ajouter d'échantillons ou de réactifs aux puits vierges.

NOTE: Si plusieurs échantillons de patients différents sont testés en même temps, une seule série de contrôles est nécessaire. Étiquetter chaque barrettes pour éviter les erreurs.

9. Sceller les micropuits avec un scellant pour plaques et incuber de 30-35 minutes 37°C au bain-marie. Si un incubateur sec est utilisé au lieu du bain-marie, augmenter le temps d'incubation de 10 minutes.

10. Diluer le conjugué 1 dans 100 dans le tampon pour échantillon. Utiliser un contenant en polypropylène.

Barrettes	**2 – 2 x 8**	**6 – 2 x 8**
AH	20 µl	60 µl
SD	2,0 ml	6,0 ml

NOTE: Le conjugué est une solution visqueuse. Amorcer les embouts de pipette en prélevant-distribuant 2-3 fois dans le conjugué avant de l'ajouter au tampon pour échantillon; rincer après chaque distribution. **Bien mélanger.**

11. ÉTAPES DE LAVAGE

    a) Aspirer ou décanter le contenu de chaque puits et presser sur de tissu-éponge absorbant.
    b) Ajouter 300 µl de solution de lavage de travail.
    c) Aspirer ou décanter.
    d) Répéter les étapes b et c pour un total de 3 à 4 lavages.
    e) Décanter vigoureusement pour enlever toute solution de lavage résiduelle. Inverser sur du tissu-éponge absorbant pour empêcher de s'assécher.

NOTE: Il est important d'enlever complètement toute la solution de lavage après le dernier lavage.

12. Ajouter 50 µl de conjugué dilué (préparé précédemment) à chaque puits SAUF aux puits désignés VIERGES.

13. Sceller les micropuits avec un scellant pour plaques et incuber de 30-35 minutes à 37°C au bain-marie. Si un incubateur sec est utilisé au lieu du bain-marie, augmenter le temps d'incubation de 10 minutes.

14. Dissoudre le substrat PNPP en ajoutant 0,5 ml d'eau déionisée ou distillée à la fiole. Remettre le bouchon et bien mélanger. Protéger de la lumière jusqu'à utilisation.

15. Diluer le PNPP 1 dans 100 dans le tampon de substrat.

Barrettes	**2 – 2 x 8**	**6 – 2 x 8**
PN	40 µl	120 µl
SB	4,0 ml	12,0 ml

    Bien mélanger. Protéger de la lumière jusqu'à utilisation.

16. ÉTAPES DE LAVAGE

    a) Aspirer ou décanter le contenu de chaque puits et presser sur de tissu-éponge absorbant.
    b) Ajouter 300 µl de solution de lavage de travail.
    c) Aspirer ou décanter.
    d) Répéter les étapes b et c pour un total de 3 à 4 lavages.
    e) Décanter vigoureusement pour enlever toute solution de lavage résiduelle. Inverser sur du tissu-éponge absorbant pour empêcher de s'assécher.

    Poursuivre rapidement les trois prochaines étapes.

17. Ajouter 100 µl de la solution de PNPP diluée à chaque puits SAUF ceux désignés VIERGES.

18. Incuber les micropuits dans l'obscurité pendant 30 minutes à la TEMPÉRATURE DE LA PIECE (22-25°C).

NOTE: Le temps et la température d'incubation suite à l'ajout du PNPP sont critiques. NE PAS varier le temps et la température d'incubation établis. À des fins d'uniformité, débuter le chronométrage rapidement après l'ajout du réactif au premier puits.

19. Arrêter la réaction par l'ajout de 100 µl de solution d'arrêt à chaque puits dans le même ordre que celui utilisé lors de l'ajout du substrat. Ajouter 200 µl de la solution d'arrêt aux puits vierges.

20. Lire la densité optique de chaque puits à 405 ou 410 nm en utilisant un filtre de référence de 490 nm. Si les résultats ne peuvent être lus immédiatement, laisser les puits dans l'obscurité jusqu'à 30 minutes.

21. Soustraire la valeur obtenue pour les puits vierges de tous les puits contenant les contrôles et les échantillons. Plusieurs instruments de lecture ÉLISA sont programmés pour faire ce calcul automatiquement.

22. Noterles résultats obtenus sur le tableau de résultats.

CONTROLE QUALITÉ

Le contrôle de qualité de Pak12 coffret est bâti à l'intérieur de cet ensemble de test par l'inclusion de sérums contrôles positifs et négatifs. Ces contrôles doivent être inclus lors de chaque essai pour aider à déterminer si des erreurs techniques ou des échecs de réactifs se sont produits.

Critères pour valider le test:

	Contrôle Négatif (IIb/IIIa rangées)	Contrôle Positif
Valeur moyenne de la densité optique (OD)	≤ 0,175	≥ 1,000

Les valeurs de densité optique obtenues pour les duplicata doivent être à l'intérieur de 20% de la moyenne des deux valeurs. Les échantillons pour lesquels les résultats sont à l'extérieur de cette limite doivent être retestés.

NOTE: De mauvaises valeurs de duplicata peuvent être causées par l'omission d'un réactif ou de l'échantillon, l'ajout inégal des réactifs, une température d'incubation inégale, une exposition à la lumière lors de l'incubation finale, ou une contamination entre puits. L'absence de résultats de tests en duplicata peut mener à l'approbation de résultats erronés.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats de tests démontrant des valeurs de densité optique égales ou plus grandes que 2X la valeur obtenue pour la moyenne des contrôles négatifs des glycoprotéines correspondantes (2 valeurs de contrôles négatifs pour chaque glycoprotéine) sont considérés comme résultats positifs.

LIMITES DE LA TECHNIQUE

- Des résultats erronés peuvent être causés par une contamination bactérienne des matériaux du test, des périodes d'incubation inadéquates, un mauvais lavage ou décantage des puits, une exposition du substrat à la lumière, l'omission de réactifs, une exposition à des températures plus élevées ou plus faibles que celles prescrites ou l'omission d'étapes.
- La présence de complexes immuns ou autres agrégats d'immunoglobulines dans les échantillons de patients peut causer une augmentation de la liaison non-spécifique et produire de faux positifs dans cet essai.
- Les résultats d'un test qui ne sont pas conformes à une spécificité d'allo-anticorps sont considérés comme étant indéterminés.
- Les résultats de cet essai ne doivent pas être utilisés comme le seul fondement d'un jugement clinique.
- Certains anticorps à faible titre et faible avidité peuvent ne pas être détectés dans cet essai.
- Les anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques de plaquettes qui ne sont pas représentés dans le tableau de résultats peuvent ne pas être détectés.
- La présence d'autres antigènes spécifiques de plaquettes situés sur GPIIb/IIIa, tels que HPA-4b (Pen^b), HPA-6a (Ca^b), HPA-6b (Ca^a), HPA-7a (Mo^b), HPA-7b (Mo^a), HPA-8a (SR^b) et HPA-8b (Sr^a), n'a pas été déterminée pour les plaquettes isolées dans le puits GPIIb/IIIa. Il est possible que des allo-anticorps dirigés contre ces systèmes soient réactifs dans ce test.
- Des anticorps contre les antigènes HLA de classe I de faible fréquence peuvent ne pas être détectés lors de l'utilisation de ce test.
- Certains anticorps anti-HLA non cytotoxiques peuvent être détectés par cette technique alors qu'ils ne réagissent pas dans le test de lymphocytotoxicité.

PERFORMANCES SPÉCIFIQUES

Lorsque bien entreposé et utilisé selon le mode opératoire décrit ci-dessus, ce produit peut détecter les anticorps contre les molécules HLA de classe I et les antigènes spécifiques de plaquettes identifiés sur le tableau de résultats inclus.

Afin d'assurer une réactivité et une spécificité adéquates, chaque lot de Pak12 coffret est testé avant la mise en vente avec des échantillons connus pour posséder les glycoprotéines identifiées sur le tableau de résultats inclus ainsi que des échantillons connus pour ne pas inclure ces mêmes anticorps.

Évaluation de la Performance

Méthode Comparative

Pak12 coffret	**Positif**	**Négatif**	**Total**
Positif	97	5	102
Négatif	13*	266	279
Total	110	271	381

Concordance: 95,3%
Co-positivité: 88,2%
Co-négativité: 98,2%
Méthode Comparative Test d'Hémagglutination Passive Inversée

NOTE : Puisque la méthode comparative comprend des plaquettes intactes entières comme cibles pour la détection des anticorps, elle peut donner des résultats positifs avec tout antigène exprimé sur les plaquettes.[10] Les cibles pour la détection des anticorps dans Pak12 coffret sont les glycoprotéines individuelles, et par conséquent ne détecteront pas des agglutinines froides ou des anticorps contre des antigènes de cellules rouges tels que Lewis.

REFERENCES

1. Kunicki TJ, Aster RH. Isolation and immunologic characterization of the human platelet isoantigen Pl(A1). Mol Immunol 1979; 16:353.
2. Van der Schoot, et al. Characterization of platelet-specific alloantigens by Immunoblotting: localization of Zw and Bak antigens. Brit. J. Haemat. 1986; 64:715-723.
3. Kuijpers, R. W. A. M. et al. Localization of the platelet-specific Ko-system antigen Ko^a/Ko^b in GP Ib/IX. Blood 1989; 74: Suppl. I, 226a.
4. Kieffer, N. et al. Immunochemical characterization of the platelet-specific alloantigen Lek^a, a comparative study with the Pl^{A1} alloantigen. Blood 1984; 64: 1212-1219.
5. Furihata, K. et al. On the association of platelet-specific alloantigen with glycoprotein IIIa. J. Clin. Invest. 1987; 80:1624-1630.
6. Kiefel, V. et al. The Br(a)/Br(b) alloantigen systems on platelets. 1989; Blood 73:2219-2223.
7. Howard JE, Perkins HA. The natural history of alloimmunization to platelets. Transfusion 1978; 18:496.
8. Dutcher JP, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH. Alloimmunization following platelet transfusion: the absence of a dose-response relationship. Blood 1981; 57:395.
9. Schiffer CA. Clinical importance of antiplatelet antibody testing for the blood bank. In: A seminar on antigens on blood cells and body fluids. Washington DC: American Association of Blood Banks, 1980; 189-208.
10. Garratty G. Review: Platelet immunology – similarities and differences with red cell immunology, 1995. Immunohematology 11 No 4: 113-4.

Immucor GTI Diagnostics, Inc.
20925 Crossroads Circle
Waukesha, WI 53186 USA

EC REP
Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Adam-Opel-Strasse 26A
Rodermark 63322
Germany

US and International Contact Information:
Technical Support : waukeshatechsupport@immucor.com

www.immucor.com

© 1996-2015 Immucor GTI Diagnostics, Inc.

303461.IFUFR Rev D
2015-05-18

Warning	Attention
Danger	Danger
H302	Nocif en cas d'ingestion
H318	Provoque des lésions oculaires graves
H412	Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme
EUH032	Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique
P264	Se laver les mains soigneusement après manipulation.
P270	Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit
P273	Éviter le rejet dans l'environnement
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage
P301 + P312	EN CAS D'INGESTION: Appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin en cas de malaise
P305 + P351 + P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P310	Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin
P330	Rincer la bouche